
A VÉRHAST OKOZÓ BAKTÉRIUMOK COLICIN TERMELÉSE, ÉRZÉKENYSÉGE ÉS LAKTOFERRIN KÖTÉSE

Ph.D. értekezés tézisei

Dr. Tigyi Zoltán



PROGRAM CÍME: A bakteriális fertőzések molekuláris
patogenezise

TÉMAVEZETŐ: Dr. Pál Tibor

PROGRAMVEZETŐ: Prof. Dr. Emődý Levente

Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar
Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézet

PÉCS, 2002.

I. BEVEZETÉS

A bakteriális vérhas kórokozói a *Shigella* genus tagjai (*S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii*, *S. sonnei*) valamint az *Escherichia coli* enteroinvazív tulajdonságú szerológiai csoportjai, az úgy nevezett enteroinvazív *E. coli* (EIEC) törzsek. A bakteriális vérhas napjainkban is az enterális fertőzések közül a kiemelkedően fontosak közé tartozik: becslések szerint 200 millió megbetegedés fordul elő a világon évente, 5 millió beteg részesül kórházi ellátásban, és 650 ezer ember hal meg a betegség következtében. Magyarországon a 2001. évben 371 eset fordult elő.

A fertőzés járványtanában meghatározó az a tény, hogy 10-100 csíra már elegendő a betegség kialakulásához, így a direkt feco-orális átvitelén túl abban a háziállat is döntő szerepet játszhat.

A bakteriális vérhas a klinikai tünetek alapján egy hasmenéses, és az azt követő vastagbélgyulladásos szakaszra osztható. A hasmenés kialakulásában a *Shigella* fajokban megtalálható enterotoxinoknak (*Shigella* enterotoxin, **ShET 1**, **ShET 2**) tulajdonítanak kóroki szerepet, amelyek elsődlegesen a vékonybélben hatva folyadék kiáramlást eredményeznek. Külön említést kell tenni a *S. dysenteriae* 1 szerotípusa által termelt ricin-szerű toxinról, amely a sejtek fehérjeszintézisét gátolja. E toxin hatására hemolitikus urémiás szindróma (**HUS**) alakulhat ki. A *S. dysenteriae* 1 okozta vérhas gyakorisága csökkenőben van, így a súlyos szövődményes esetek száma is.

A vérhas jellegzetes pathológiai alapját a vastagbélgyulladás (colitis) képezi. A gyulladás göccos, a colonoscopia során vérző, kis kiterjedésű, gennyes izzadmány által fedett fekélyek láthatók. A betegség jellemző klinikai tünetei a láz és a tenesmus, azaz az improduktív, de fájdalmas, görcsös székelési inger. A széklet általában kis mennyiségű, nyákos, véres és gennyes. A betegség az esetek többségében, amennyiben a gazdaszervezet védekező képessége megfelelő, körülbelül egy hét alatt tünetmentesen, önmagától gyógyul.

A shigellák és EIEC törzsek fakultatív intracelluláris patogének. A kórokozók invazivitását egy $\{1.2-1.4 \times 10^5 \text{ kilodalton kDa}, \sim 210-230 \text{ kilobázis pár (kbp)}\}$ nagyságú, alacsony kópiaszámú, nem konjugatív, extrakromozómális DNS, ún. inváziós plazmid (**pINV**) kódolja. A pINV által kódolt fehérjék közül, a hámsejt invázióhoz leginkább szükségeseket ún. *invazinnak* tekintjük. Kifejeződésüket a környezet változásainak (pl. pH, hőmérséklet változás) megfelelően a kórokozók kromozómáján található,

virulenciát szabályozó gének [virulence regulator gene (*vir*)] regulálják. A teljes betegségkötő képességhez szükséges a kromoszómán és a pINV-on található genetikai elemek közötti visszacsatolt szabályozás az ún. „genetikai párbeszéd”.

Az egyik legegyszerűbb, a shigellák invazív képességét *in vitro* vizsgáló módszer a virulens baktérium kongóvörös (KV) festéket kötő képességén alapul. E festékről ismert, hogy szimmetrikus molekula szerkezete miatt a molekulák képesek önmagukkal összekapcsolódni (autoaggregáció). Az így létrejött szupramolekuláris szerkezetek, a monomer molekulákhoz képest új fizikokémiai tulajdonságokkal bírnak (kvázi folyadékkristály). Ez a szerkezet sokrétű, komplex kapcsolatot hozhat létre számos eukaryota és bakteriális fehérjével, ami a működésük módosulásában tükröződhet vissza. Munkánk során mi is vizsgáltuk a folyamat egyes részleteit.

Járványtani és klinikai tanulmányok bizonyítják, hogy a vérhas betegség kiállása után relatív védettség alakul ki a következő fertőzéssel szemben. Azonban ez az immunitás csak az adott baktériumfaj adott szerocsoportjával szemben nyújt közelítően 75%-os védelmet, más szerocsoportokkal szemben nem. A vérsavóban található G és M típusú immunglobulinokon (Ig) kívül IgA típus is jelen van a nyálkahártyákon, váladékokban, így az anyatejben is. Bizonyított, hogy az anyatejben lévő IgA típusú ellenanyagoknak szerepe van a csecsemőkori a vérhas kórokozóival szembeni passzív immunitásban. Intracelluláris kórokozóról lévén szó, a sejt-mediált immunitás szerepe valószínű, de részleteiben kevésbé vizsgált.

A gazdaszervezet dysentéria baktériumokkal szembeni küzdelmében fontos szerepet játszanak nem fajlagos védőmechanizmusok is, mint pl. a vastagbél fokozott mozgása, a globuláris sejtek nyákszekréciója, melyek fokozzák a sejten kívüli baktériumok eltávolítását a vastagbélből. Ugyancsak védő szerepe van a normál bélflóra baktériumainak, és az immunrendszer sejtjeinek. Ezen sejtek aktiválódásuk során különböző, a gyulladáshoz kapcsolódó reakciókban (leukotriének, prostaglandinok), illetve a specifikus immunrendszer reakcióinak beindításában szerepet játszó anyagokat (interferon, tumor nekrozis faktor) termelnek. Mindezeket túl e sejtek direkt mikroba ellenes hatású anyagokat, mint pl. mielo-peroxidáz és laktoferrin (Lf) is bocsátanak ki magukból. Ezek közül a laktoferrin, amely a vaskötő fehérjék családjába tartozik és a gyulladáshoz kapcsolódóan elsősorban a neutrophil granulocytákból szabadul fel, egyszerre több funkciót is ellátó akut fázis fehérje, amely antimikrobiális hatásán túl fontos szerepet játszik az immun- és a gyulladáshoz kapcsolódó szabályozásában is. Megtalálható a nyálkahártyákon, így a bélben, valamint váladékokban, így a tejben is. Mindezek alapján tartottuk érdemesnek vizsgálatainkba bevonni ezt a fehérjét.

)

A *Shigella* és EIEC baktériumok a szervezetbe kerülve nemcsak a nem fajlagos védekezés sejtjeivel, molekuláival kerülnek szembe, hanem a vastagbélben nagyszámban jelenlévő, normál flórához tartozó baktériumokkal szembeni versengés kihívásával is, amely a tápanyagokért és megtapadáshoz szükséges felületért folyik. Ebben a versengésben jelenthetnek előnyt az ún. colicinek, amelyeket az *Enterobacterium*ok családjába tartozó fajok termelnek és baktériumpusztító hatásukat azonos vagy rokon fajokon fejtik ki. Ezek a fehérjék nukleinsav lebontó, membránokban pórust formáló vagy sejttel felépítését gátló hatásukat a cél baktérium adott sejtfel-szín receptorán keresztül hatva fejtik ki. Vizsgálataink másik tárgya ezért a vérhas egyik gyakori kórokozója a *Shigella sonnei* által termelt a 7-es típusú colicin (Scol7) vagy más néven colicin Js lett.

E colicinről ismert volt, hogy vele szemben az EIEC törzsek 90%-a, a *S. sonnei* törzsek 100%-a és a *S. boydii* törzsek több mint fele érzékeny, míg egyéb *E. coli* törzsek rezisztensek. Jóllehet ismert volt, hogy az EIEC törzsek Scol7-el szembeni érzékenysége és a tengerimalac keratocunjunctivitis teszttel kimutatott virulenciájuk között összefüggés van, hasonlóan ahhoz, mint az a kongóvörös kötő képesség esetében is ismert. Azonban a korábbi vizsgálatok arra nézve nem adtak magyarázatot, hogy az e colicinnel szembeni érzékenységet felelős gének a kromozómán vagy a pINV-on találhatóak-e.

Mára már meglehetősen sok adat áll rendelkezésünkre a vérhas molekuláris szintű kórfejlődéséről. Szintén viszonylag részletes ismereteink vannak a vérhast okozó baktériumokkal szembeni fajlagos immunválaszról, azonban jóval kevesebbet tudunk a szervezet nem fajlagos védekezésében szerepet játszó folyamatairól. Ezek a folyamatok a védekező rendszer első vonalának számítanak, és fontos szerepük van a kórokozókkal szembeni védelemben, illetve a fajlagos immunválasz beindításában.

Szintén kevés adat volt ismert a dysentériát okozó baktériumok és a bélflóra közötti kölcsönhatásokról. Nyilvánvaló ahhoz, hogy a kórokozók megtapadhassanak, majd szaporodhassanak, a gazda szöveteit megtámadhassák, illetve a bélben túlélhessenek, olyan faktorok széles körével kell rendelkezniük, amelyek a bélben lévő baktériumokkal szembeni versenyben előnyhöz juttatják a kórokozókat.

Éppen ezért munkánk tárgyául két tényezőt, a gazdaszervezet és a kórokozó, illetve a baktérium-baktérium közötti kölcsönhatások vizsgálatát választottuk. Ennek megfelelően vérhast okozó baktériumok egyes fajainak kölcsönhatásait vizsgáltuk a laktoferrinnel, mint a nem fajlagos védekezésben fontos antimikrobiális fehérjével, és egy colicinnel, mintegy a baktérium által termelt, antibakteriális hatással rendelkező anyaggal.

II. CÉLKITŰZÉSEK

- I. A *S. flexneri* laktoferrin kötése molekuláris mechanizmusának tanulmányozása.
- II. *S. sonnei* által termelt 7-es típusú colicin genetikai hátterének vizsgálata.
- III. A 7-es típusú colicinnel szemben mutatott érzékenység és az inváziós plazmid hordozás közötti összefüggés vizsgálata *S. flexneri* és enteroinvazív *E. coli* törzsbén.
- IV. Kongóvörös és különböző colicinek közötti kölcsönhatás vizsgálata.

III. FELHASZNÁLT ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Baktérium törzsek, plazmidok. Lactoferrin kötési vizsgálatokhoz a *S. flexneri* összes szerotípusából egy-egy reprezentánst, továbbá klinikai mintákból származó törzseket használtunk. A Lf.–*S. flexneri* közötti kölcsönhatás jellemzésére a *S. flexneri* M90T, 5a szerotípusú virulens törzset használtunk (S.B Formal WRAIR. USA).

Colicinnel kapcsolatos vizsgálatokhoz a 7-es típusú colicin termelő és az erre érzékeny indikátor *S. sonnei* referencia törzseket V. Horáktól (Csehország), vad típusú Scol7 termelő törzseket az Egyesült Királyságból (Central Public Health Lab., London), más colicin termelő és indikátor referencia törzseket az Országos Epidemiológiai Központból (Budapest), és V. Brauntól (Tübingen, Németország) szereztük be. A konjugációs kísérletekhez a mobilizáló plazmidot tartalmazó törzset M. Robinsontól (Bristol, Anglia) és a laboratóriumi *E. coli* J53 K12 törzset N. Dattától (Central Public Health Lab. London) kaptuk meg. A klónozási vektor plazmidokat Bluescript II, KS⁽⁻⁾ Stratagene és SE380 Invitrogene cégektől vásároltuk. Háttértörzsnek *E. coli* XL-1 Blue MRF⁽⁺⁾ (Stratagene) használtunk.

Táptalajok. Kereskedelembe kapható standard, illetve kémiai összetevőiben meghatározott táptalajokat (M9 minimál) használtunk a colicin, illetve a KV tartalmú táptalajok kivételével. Colicin tartalmú táptalaj: a colicin termelő baktérium folyékony 24 órás tenyészet felülúszójának steril szűrlé-

hez azonos mennyiségű, kétszeres koncentrációjú, 24 g/l agart tartalmazó Luria-Bertani táptalajt adtunk 50 °C-on, majd Petri-csészékbe öntöttük. A kongóvörös trypton szója agar (KV-TSA) táptalaj esetében a trypton szója levest 1,7% agarral szilárdítottuk, amelyhez 100µg/ml KV festéket adtunk.

Kémiai anyagok, enzimek. A szarvasmarha eredetű (bovin) BLf-en kívül, amely a Swedish Dairies Association, (Malmö) ajándéka volt, minden egyéb anyagot a forgalmazóktól vásároltunk.

EIEC törzs KV-t nem kötő származékainak szelekciója Az EIEC Nr1 KV-t nem kötő származékainak szelekciója KV-TSA lemezeken történt az előző módszerhez hasonló módon. A KV-t nem kötő (KV) telepeket vettük fel a lemezekről, majd a colicinnel szembeni érzékenységüket megvizsgáltuk.

Ipa C ELISA. A pINV intakt működését a Floderus és mtsi. által kifejlesztett, az IpaC antigénre fajlagos ELISA rendszerrel vizsgáltuk. Invazivnak tekintettük azt a törzset, ahol a színreakció intenzitása OD 0,2 felett volt.

DNS TECHNIKÁK

Plazmid preparálás. A pINV-ot Kado és Liu szerint, a kis molekulású plazmidokat Ish-Horowicz-Burke módszerével vagy a gyártók utasításai szerint használt plazmid tisztító kitékkel preparáltuk. Az agaróz gélek kiértékeléséhez, a DNS mennyiségének méréséhez számítógépes gél dokumentáló rendszert használtunk, Bio-Print UV / vis (Vilbert Lourmat, France), Bio 1D verzió '97 programmal.)

pINV átvitele EIEC és *Shigella flexneri* törzsekből *E. coli* J53 K12 törzsbe konjugációval. A nem konjugatív pINV átvitelét a pMR5 plazmid által biztosított, transzpozon segített átviteli rendszer alkalmazásával végeztük.

A rekombináns DNS technikák. A DNS hasításához, klónozásához, a PCR-hoz és PCR klónozáshoz a kézikönyvekben leírt standard módszereket használtuk.

Elektro-transzformáció. A colicin illetve a rekombináns plazmidokat a donor baktérium sejtekbe Progenetor II. PG200 (Hofer) elektroporátorral juttattuk be, majd a megfelelő szelekciós rendszert alkalmazva a transzformált sejteket növesztettük fel.

DNS szekvenálás. A szekvenálási reakciók egy részében EXCEL II Long-Read szekvenáló kitet használtunk, az utasítások szerint. A reakciótermékek futtatását 0,5 mm vastag, 5,75% (Long Ranger™) akrilamid gélben

ALFexpress félautomata (Pharmacia) DNS szekvenáló készülékkel végeztük. A reakciók fennmaradó részét BigDye Primer szekvenáló kittel (Perkin-Elmer), a szekvencia meghatározását ABI PRISM 310 (Perkin-Elmer) automata szekvenáló készülékkel végeztük.

Szekvencia elemzés A kapott szekvenciák elemzését, összevetésüket a Génbank adatbázisával a szolgáltató szabad hozzáférésű programjaival végeztük.

A LAKTOFERRIN KÖTÉS VIZSGÁLATÁNAK MÓDSZEREI

S. flexneri lactoferrin kötése. 0,1 ml 10^9 baktérium sejt/ml PBS puffer szuszpenzióhoz azonos térfogatú PBS puffert és 8 ng jódt¹²⁵ radioaktív izotóppal jelölt Lf-t adtunk. Két óra inkubáció (37°C) után 2 ml 4°C-os puffer hozzáadásával a reakciót leállítottuk. A centrifugálás és a felülúszó eltávolítása után a leülepített baktérium sejtekhez kötődött Lf radioaktivitását γ -számlálóval mértük, és a hozzáadott összes radioaktivitás %-ában adtuk meg.

¹²⁵I-Lf kötődésének időbeni kinetikája. A Lf kötési kísérlet szerint jártunk el, de 1-től 420 percig tartó idő közben, növekvő inkubációs idők után mértük a baktériumok által kötött ¹²⁵I-Lf radioaktivitását.

¹²⁵I-Lf jelölt humán és bovin Lf helyettesíthetősége jelöletlen Lf-el. Az inkubációig az ¹²⁵I-Lf-kötési kísérletnek megfelelő lépéseket végeztünk, majd 1-től 10^5 nM mennyiségig jelöletlen humán, illetve bovin Lf-t adtunk a rendszerhez külön-külön, majd további 1 óra inkubálás után mértük a baktériumok által kötött ¹²⁵I-Lf radioaktivitását.

NaCl és kaotrop anyagok hatása a sejtek Lf kötésére . A ¹²⁵I-Lf-kötési kísérletnek megfelelő lépések után konyhasót, káliumtiocianidot és ureát adtunk a baktérium-Lf komplexhez 1-5 M, 1-5 M és 1-8 M koncentrációkban, majd 1 óra inkubáció után a baktériumhoz kötve maradt radioaktivitást mértük.

Különböző, a bélben található anyagok hatása a baktérium-Lf kötésre.

A kísérletet a fentiekkel azonos módon végeztük, de különböző, a bélben is előforduló anyagokat (pl. mucin, epesav nátrium sója, vaskötő, és vastartalmú szerves vegyületek stb.) adtunk a baktérium-Lf komplexhez, majd a szokásos módon vizsgáltuk a kötve maradt ¹²⁵I-Lf radioaktivitását.

A baktérium Lf kötő képessége telíthetőségének vizsgálata. A növekvő mennyiségű ¹²⁵I-Lf (0,1-10 μ g) kötést vizsgáltuk, jelöletlen Lf mentes rend-

)

szerben, illetve 50-szeres jelöletlen Lf jelenlétében. Az előbbi rendszerben mért eredmény a teljes Lf kötés mennyiségnek, az utóbbiban mért pedig a specifikus kötő képességnek felelt meg. Az eredményekből Scatchard analízissel meghatároztuk az egy baktériumon átlagosan található humán- és bovin Lf-kötő struktúrák számát és affinitását.

Sejtboríték és külső membrán preperátumok készítése és vizsgálatuk Western blot módszerrel A preparálást Schnaitman szerint Triton X-100 extraháló oldat használatával végeztük, virulens *S. flexneri* M90T, illetve avirulens (pINV mentes) törzson. A mintákban lévő fehérjéket Laemmli szerinti SDS-poliakrilamid géll elektroforézissel elválasztottuk egymástól, majd a nitrocellulóz filterre elektroblottolt minták Lf kötő képességét tormaperoxidáz enzimmel jelölt humán és bovin Lf-el vizsgáltuk. Ugyancsak megvizsgáltuk a mintákat anti-Po-I monoklonális ellenanyaggal, amely fajlagosan kötődik az Enterobacteriaceae család porin-fehérjéinek konzervatív doménjéhez. A kötődött ellenanyagot anti-egér peroxidáz-jelölt második ellenanyaggal tettük láthatóvá. Az ismertetett kísérleteket a minták natív és hő kezelt formáival is elvégeztük.

COLICIN VIZSGÁLATÁVAL KAPCSOLATOS KÍSÉRLETEK MÓDSZEREI

Colicin termelő képesség vizsgálata. A törzsek colicin termelő képességét Frederiq szerinti makro-kolónia módszerrel vizsgáltuk.

Colicin termelés. Egyrészt a colicin termelő baktérium 1 napos Luria leves tenyészetének sterilre szűrt felülúszóját használtuk (felülúszó), másrészt a fenti tenyészetek lecentrifugált baktérium üledékét 77mM Tris, pH 7,4 pufferben az eredetihez képest egytizednyi térfogatban szuszpendáltuk fel, majd 16 óráig 4°C-n történő kivonást követően a baktériumokat lecentrifugáltuk (14000 g), a kivonatotak sterilre szűrtük (hypo-ozmotikus kivonat). Egyes esetekben a termelő törzsek éjszakai tenyészeiteinek lecentrifugált baktériumait a fenti hypoozmotikus pufferben felszuszpendálva 300W teljesítményű ultrahang energiával roncsoltuk, intenzív hűtés közben. Centrifugálás után (14000 g) a felülúszókat sterilre szűrve használtuk (teljes sejt kivonat).

Colicin termelés indukálása mitomycin C-vel. A törzsek éjszakai tenyészeiteit egységes optikai sűrűségűre ($OD_{\lambda 600} 0,35$) és azonos térfogatra állítottuk be, ezt követően a sejteket lecentrifugáltuk. A baktériumokat friss, illetve friss mitomycin C-t tartalmazó (0,5µg/ml) táptalajban szuszpendáltuk fel. Három óráig rázótermosztátban (200 rpm, 37°C) történt inkubálás után a felülúszók colicin tartalmát meghatároztuk.

Colicin termelés indukálása IPTG-vel. A fentiekkel analóg módon végeztük a kísérleteket, de az inkubáció lejárta után a sejtekben lévő colicint is kivontuk a sejtek ultrahanggal történő feltárásával, a fentebb már említett módon.

Colicin mennyiségének mérése és colicin érzékenységi vizsgálat. Richardson szerinti agar-diffúziós módszert alkalmaztunk, ahol az agar lemez lyukaiba colicin minták felező hígításaiból mértünk 20 μ l-t, majd az érzékeny sejtekkel felülrétegeztük és éjszakán át inkubáltuk. A lyukak körüli gátlási zónákat digitális tolmérővel mértük meg. A colicin koncentrációt munkaegységben (arbitrari unit, AU) adtuk meg, ahol 1 AU megfelelt annak a legnagyobb hígításnak, ahol még tiszta gátlási zónát kaptunk.

A különböző törzsek colicin érzékenységét az előzőekkel azonos módon vizsgáltuk, azzal az eltéréssel, hogy standardizált colicint és négy részre osztott táptalajokat használtunk. A kongóvörös hatásának vizsgálatakor a festéket 100 μ g/ml koncentrációban alkalmaztuk a megfelelő festékmentes kontrollok mellett.

A natív Scol7 molekulásúlyának becslése ultrafiltrációval. A colicin tartalmú felülúszókat ultrafiltrációs membránokon szűrtük át, amelyek molekulásúly kizárási értékei 10kD, 30kD, 50kD és 100kD volt. A szűrletek és a koncentrátumok colicin tartalmát meghatároztuk.

pScol7 plazmiddal elektro-transzformált klónok szelekciója. Az elektrotranszformáció során a colicin plazmidot felvett klónokat colicin tartalmú táptalajon szelektáltuk felhasználva azt a tényt, hogy a colicin plazmid a saját colicinnel szembeni védettséget (immunitás) kódoló géneket is tartalmazza. A lemezeket bársonykorong módszerrel colicin mentes lemezekre másoltuk és 1 nap inkubáció után a telepeket kloroform gőzzel előltük, majd az érzékeny indikátor sejttel felülrétegeztük. Újabb inkubáció után a gátlási zónák segítségével azonosíthatóak voltak az eredeti lemezen a colicint termelő elektro-transzformáns telepek. A colicin plazmid jelenlétét plazmid elektroforézissel is ellenőriztük.

Növekvő mennyiségű KV hatása a Scol7 baktericid hatására. 38,4 AU colicint tartalmazó TSB táptalajhoz növekvő mennyiségben adtunk (0,786-600 μ g/ml) KV-t és azonnal indikátor sejteket ($1,2 \times 10^7$ sejt/ml) is. 120 perc, 37°C inkubáció után a csiraszámokat megállapítottuk, majd a megfelelő kontrollok alkalmazása mellett, statisztikailag értékeltük.

Indikátorsejtek előinkubációja Scol7-el. TSB táptalajban levő 4×10^6 indikátor sejthez 38,4 AU colicint adtunk, majd 0 illetve 37 °C-n inkubáltuk 1 órán át. A sejtek többszöri mosásával a nem kötődött colicint a keverékből eltávolítottuk, majd növekvő mennyiségű KV-t (50, 100, 800 μ g/ml) adtunk a

)

csövekhez, és további inkubálás (120 perc 37°C) után a csíraszámokat meghatároztuk, majd a megfelelő kontrollok alkalmazása mellett, statisztikailag értékeltük.

Colicin rezisztens mutánsok szelekciója colicin tartalmú táptalajon.
EIEC Nr1 törzs colicin érzékeny és KV-t kötő telepéből indított friss tenyészetéből 4×10^8 sejtet juttattunk a colicint tartalmazó agar lemezekre, majd 1 nap inkubáció után a kinőtt colicin érzékenységet veszített telepeket felvettük, majd a pINV jelenlétét plazmid elektroforézissel ellenőriztük.

IV. ÚJ EREDMÉNYEK ÉS TÉZISEK

IV/1. A *Shigella flexneri* laktoferrin-kötő fehérjéi

1. A *Shigella flexneri* törzsek képesek voltak mind az emberi (humán) laktoferrint (HLf)-t, mind a szarvasmarha eredetű (bovin) (BLf)-t kötni.
2. Vaskötő és vastartalmú molekulák (transzferrin, hemin) valamint egyéb a bélrendszerben előforduló anyagok, pl. dezoxikolát, glukokonjugátomok, kismértékben gátolták a kötést.
3. A baktérium-HLf, illetve -BLf közötti kötést dóziszfüggő módon gátolta mind homológ, mind heterológ Lf.
4. A baktérium-Lf közötti kötés fiziológiás só koncentráció mellett stabil volt, ezt csak a fiziológiást többszörösen meghaladó só koncentráció bontotta fel. Kaotrop molekulák, pl. urea, káliumferrocianid a kötést felbontotta.
5. A baktérium Lf kötő képességét dóziszfüggő módon lehetett telíteni, mind HLf-nel mind pedig BLf-nel.
6. Kísérleteink eredményeiből kiszámíthatóvá vált a *S. flexneri* baktérium fajlagos Lf kötőhelyeinek átlagos száma; 4800 / baktérium sejt HLf, illetve 5600 / baktérium sejt BLf esetében. A baktérium Lf-kötőhelyeinek affinitása 6,6-szor nagyobbak bizonyult HLf esetében, mint BLf esetében.
7. A baktérium Lf kötő fehérjéi külsőmembrán fehérjéknek bizonyultak. Ezen fehérjék közül az egyik, egy 39-kDalton molekula tömegű, az antiporin monoklonális antitesttel adott reakciója, illetve a hő hatására történő jellegzetes disszociációja alapján, porin fehérjének bizonyult.
8. A *S. flexneri* Lf-kötő fehérjéi azonosak voltak a törzs virulens és avirulens származéka esetében.

IV/2. A *Shigella sonnei* 7-es típusú colicin aktivitás génjének azonosítása

1. A *Shigella sonnei* 7-es típusú colicin (Scol7) termeléséért felelős genetikai elemeket egy 3,4 megadalton (5,1 kbp) nagyságú plazmidon (pScol7) azonosítottuk.
2. A pScol7 plazmid rokonságot mutatott a colicin E1 plazmiddal (pColE1), mivel nukleotid szekvenciájuk 87%-ban azonos volt a pScol7 hosszának ~60%-ában.
3. A pScol 7 plazmid eddig ismert nukleotid sorrendekkel nem, vagy csak kismértékben azonosságot mutató részén, egy rövid DNS szakaszt találtunk, amely a colicin E1 gének operon-promoter régiójával azonos nukleotid sorrendet mutatott.



4. Az operon-promóter régió indukálható volt mitomycin C-vel kiváltott SOS válasszal, amely fokozta a baktérium colicin termelését.
5. Az SOS indukálható operon-promóter szakasz mögött sikerült egy 94 aminosavat kódoló (*sc7a*) gént azonosítani, amelyről bizonyítottuk, hogy a Scol7 termelésért ez a gén a felelős.
6. Az ultrafiltrációs kísérletek alapján a natív Scol7 molekulatömege 50 és 100 kD közöttinek adódott, míg az aminosav sorrendből számított molekulatömeg 11,2 kD-nak, ami a molekula autoaggregációjának lehetőségét veti fel.
7. A Scol7 aminosav sorrendjében egy pentapeptid szakasz nagyfokú azonosságot mutatott a TonB fehérje kötőhelyéhez (TonB doboz). Valószínűsíthető, hogy a Scol7 a célsejtbe juttatásához a Ton-függő felvételi rendszer játszik szerepet, így a colicinek B csoportjába sorolható.
8. Az operon-promoter régió mögött, de az (*sc7a*) gén előtt, sikerült egy 65 aminosavat kódoló gént azonosítani. A megfelelő szubklónok IPTG-vel történő colicin termelést indukáló kísérletek alapján valószínűsíthető, hogy szerepet játszik a colicin sejtől történő kijuttatásában.

IV/3. *Shigella flexneri* és enteroinvazív *Escherichia coli* inváziós plazmidja és a 7-es típusú colicinnel szembeni érzékenység közötti összefüggés vizsgálata

1. Az általunk vizsgált virulens *S. flexneri* törzsek egyike sem mutatott érzékenységet a 7-es típusú colicinnel szemben.
2. A vizsgált *S. sonnei* és enteroinvazív *E. coli* (EIEC) törzsek többsége érzékenységet mutatott a 7-es típusú colicinnel szemben.
3. Az EIEC törzsben az inváziós plazmid (**pINV**) elvesztését a Scol7-tel szembeni érzékenység elvesztése kísérte.
4. Az EIEC baktérium pINV-jának *E. coli* K12 törzsbe juttatása a baktériumot érzékennyé tette Scol7-tel szemben. Ez igazolja, hogy a colicinnel szembeni érzékenységet kódoló gének az EIEC pINV-ján találhatóak.
5. Az EIEC törzs pINV-ja a *S. flexneri* avirulens változatát érzékennyé tette a colicinnel szemben. Az eredmény alapján megállapítható volt, hogy a *S. flexneri* és az EIEC törzsek között, a Scol7-tel szemben mutatott különbséget nem a két baktérium species eltérő kromoszómális háttere okozza.
6. A *S. flexneri* pINV-jának az *E. coli* K 12 törzsbe juttatása a baktérium colicinnel szembeni rezisztenciáját nem változtatta meg. Ezek alapján megállapíthatuk, hogy a *S. flexneri* pINV-ja nem hordozza a colicinnel szembeni érzékenység genetikai determinánsait.

7. A *S. flexneri* és az EIEC törzsek közötti különbség a Scol7-tel szembeni érzékenységben újabb példa arra, hogy különbség van a vérhast okozó baktériumok pINV-jainak a virulencia tulajdonságokkal összefüggést nem mutató génjeiben.

IV/ 4. Különböző colicinek és a kongó vörös közötti kapcsolat hatása a colicinek bakteriocidiájára

1. A kongóvörös (KV) gátolta a Scol7 és néhány más colicin baktériumölő képességét.
2. A KV gátló hatása nem volt köthető egyik colicin hatástani csoporthoz sem.
3. A KV a Scol7 bakteriocid hatását dóziszfüggő módon gátolta.
4. A KV-sel előinkubált colicinre érzékeny sejteket megmosva, a KV colicint gátló hatása eltűnt. Az eredmény alapján megállapítható volt, hogy a kölcsönhatás a baktérium sejt és a KV között nem felel meg a klasszikus ligand-receptor közötti kölcsönhatás követelményeinek.
5. A KV nem volt képes leszorítani és helyettesíteni a colicin molekulát, miután az már a baktériumsejt receptorához lekötődött.
6. A KV különböző mértékben gátolta azokat a colicineket is, amelyek a baktérium sejt egyazon receptorát használják a sejtbe történő bejutáshoz. Ezek alapján feltételezzük, hogy a KV, illetve autoaggregációval létrejövő szupramolekuláris szerkezetei, elsősorban magukkal a colicin molekulákkal lépnek kölcsönhatásba.
7. A kísérleteink alapján az is megállapítható volt, hogy a Scol7 sejtfelszíni receptora nem azonos a virulens, vérhast okozó baktériumok KV festéket kötő sejtfelszíni komponenseivel. Bár mindkét tulajdonság, azaz a Scol7-el szembeni érzékenység és a KV kötő képesség is összefüggésben van, vérhast okozó baktériumok inváziós plazmidjaival.

IV. A DISSZERTÁCIÓ ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ, KÖZLEMÉNYEK, ELŐADÁSOK, POSZTEREK:

Közlemény:

Tigyi, Z., Kishore, A. R., Mæland, J. A., Forsgren, A., Naidu, A. S., Lactoferrin-Binding Proteins in *Shigella flexneri*. *Infect. Immun.* (1992). 60: 2619-2626.

Előadások idézhető absztraktjai:

Tigyi, Z., Palmafy, B., Pal, T., Possible mechanisms of the blocking effect of congo red on *Shigella sonnei* type 7 colicin. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* (1999). 46:127-127. (Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése (1998))

Tigyi, Z., Pal, T., Relationship between the sensitivity to *Shigella sonnei* colicin type 7 and presence of invasion plasmid in enteroinvasive *Escherichia coli*. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* (2000). 47:195-196. (13th Congress of the Hungarian Society for Microbiology. (1999))

Tigyi, Z., Pal, T., Identification of the activity gene of colicin type 7 of *Shigella sonnei* (In press). *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* (in press) (Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése (2001))

Poszterek idézhető absztraktjai:

Tigyi, Z., Palmafy, B., Pal, T., The effect of congo red on sensitivity to different colicins. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* (1997). 44:405-405. (Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése (1996))

Tigyi, Z., Pal, T., The effect of colicin – congo red interaction on the bactericidal activity of colicins acting on the same receptor molecule. (In press). *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* (in press) (Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése (2001))

Tigyi, Z., Pal, T. The relationship between colicin type 7 sensitivity and the invasion plasmids of *Shigella flexneri* and enteroinvasive *Escherichia coli*. (In press). *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* (in press) (Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése (2001))

Tigyi, Z., Pal, T., Tomcsanyi, T., Identification of the plasmid responsible for the colicin type 7 production in *Shigella sonnei*. (12th Congress of the Hungarian Society for Microbiology, (1995))

Egyéb publikációk:

Kalfas S, Tigyi Z., Wikström M, Naidu A. S., Laminin binding to *Prevotella intermedia*. *Oral. Microbiol. Immunol.* (1992). 7: 235-239.

Gerlach, D., Schalén, C., Tigyi, Z., Nilsson, I. B., Forsgren, A., Naidu, A. S., Identification of a novel lectin in *Streptococcus pyogenes* and Its Possible Role in Bacterial Adherence to Pharyngeal Cells. *Current Microbiology.* (1994). 28: 331-338.

Rajnavolgyi, E., Nagy, Z., Kurucz, I., Gogolak, P., Toth, G. K., Varadi, GY., Penke, B., Tigyi, Z., Hollosi, M., Gergely, J., T Cell recognition of the postrationally cleaved intersubunit region of influenza virus. *Molec. Immunol.* (1994). 31:1403-1414.